DOI:10.11931/guihaia.gxzw202406026

广西莪术叶枯病病原菌鉴定、生物学特性及室内药剂筛选

宋利沙，蒋妮，丘卓秋，詹鑫婕，张占江*，韦树根，施力军，林伟，黄琦，闫志刚

（广西壮族自治区药用植物园，广西道地药材高品质形成与应用重点实验室，南宁 530023）

摘　要：为明确引起广西钦州市的广西莪术叶枯病的病原菌，探究其生物学特性，并筛选出有效的防治药剂。该研究利用常规组织分离法对感病叶片进行病原分离，基于柯赫氏法则进行致病性测定，并通过病原菌形态特征并结合其 ITS、TUB 基因序列联合分析确定其分类地位，同时利用菌丝生长速率测定法研究病原菌的生物学特性及 4 种杀菌剂的敏感性测定。结果表明：（1）根据病原菌菌落、孢子形态等特征，以及多基因联合系统发育分析确定广西莪术叶枯病病原菌为间座壳属真菌菜豆间座壳。（2）最适于该病原菌生长的培养基是 PDA，最佳碳、氮源分别是葡萄糖和蛋白胨；25~28 ℃利于菌丝生长，致死温度为 56 ℃；最适 pH 5~7 利于菌丝生长；全光照利于菌丝生长。（3）毒力测定结果表明，供试的 4 种杀菌剂对广西莪术叶枯病菌均表现较强的抑制活性，其中 250 $g·L^{-1}$ 吡唑醚菌酯 EC 和 75%肟菌·戊唑醇 WG 的抑菌效果较好，EC_{50} 值分别为 0.055 0、0.121 6 $μg·mL^{-1}$。综上所述，广西莪术叶枯病菌为间座壳属真菌菜豆间座壳，其菌丝生长受温度、光照、pH、碳氮源条件影响明显，250 $g·L^{-1}$ 吡唑醚菌酯 EC 和 75%肟菌·戊唑醇 WG 可作为防治叶枯病的候选药剂。该研究结果为广西莪术叶枯病的有效防治提供了理论指导。

关键词：广西莪术，叶枯病，病原菌鉴定，生物学特性，药剂筛选

中图分类号：Q945.8　　　　　　**文献标识码**：A

Identification, biological characterization and fungicide screening of leaf blight causing *Curcuma kwangsiensis*

SONG Lisha, JIANG Ni, QIU Zhuoqiu, ZHAN Xinjie, ZHANG Zhanjiang*, WEI Shugen, SHI Lijun, LIN Wei, HUANG Qi, YAN Zhigang

(*Guangxi Botanical Garden of Medicinal Plants*, *Key Laboratory of Guangxi for High-quality Formation and Utilization of Dao-di Herbs*, Nanning 530023, China)

Abstract: In order to identify the pathogen causing leaf blight of *Curcuma kwangsiensis* in Qinzhou city, Guangxi, explore its biological characteristics and screen out effective fungicides. In this study, pathogens were isolated from infected leaves by conventional tissue separation method, pathogenicity was determined based on Koch’s rule, and their classification status was determined by morphological characteristics of the pathogen combined with the analysis ITS and TUB gene sequences. At the same time, biological characteristics of the pathogen and the sensitivity of four fungicides were studied by mycelium growth rate measurement method. The results were as follows: (1) *Diaporthe phaseolorum* was identified as the pathogen of leaf blight of *Curcuma kwangsiensis* in Guangxi based on the characteristics of colony, spore morphology and multi-gene

---

基金项目：广西科技重大专项（桂科 AA22096021）；广西中医药适宜技术开发与推广项目（GZSY23-01）；广西中医药多学科交叉创新团队（GZKJ2305）；广西壮族自治区中医药管理局项目（GXZYA20230012）；广西壮族自治区中医药管理局项目（GXZYA20230006）。

第一作者：宋利沙（1987—），博士，副研究员，主要从事药用植物病虫害防治研究，（E-mail）lishasong@126.com。

***通信作者**:张占江，博士，研究员，主要从事药用植物保育与开发利用研究，（E-mail）zzj1811@163.com。

phylogenetic analysis. (2) The most suitable medium for growth of the pathogen was PDA, and the best carbon and nitrogen sources were glucose and peptone, respectively. The temperature between 25 ℃ and 28 ℃ was favorable for mycelium growth, and the lethal temperature was 56 ℃. pH 5−7 was favorable for mycelial growth. Full light was favorable for mycelial growth. (3) The results of the virulence test showed that all the four fungicides tested showed strong inhibitory activity against *C. kwangsiensis* leaf blight. Among them, 250 $g\cdot L^{-1}$ prothioconazole ester EC and 75% trifloxystrobin tebuconazole WG showed the best inhibitory effect, with EC_{50} values of 0.055 0 and 0.121 6 $\mu g\cdot L^{-1}$, respectively. In conclusion, the pathogen of leaf blight of *C. kwangsiensis* belongs to *Diaporthe phaseolorum*. The mycelial growth of *D. phaseolorum* was significantly affected by temperature, light, pH, carbon and nitrogen source conditions. 250 $g\cdot L^{-1}$ pyrazole ester EC and 75% oxime · pentazolol WG could be used as candidate fungicides to control leaf blight. The results provide theoretical guidance for effective prevention and control of leaf blight of *C. kwangsiensis* in Guangxi.
Key words: *Curcuma kwangsiensis*, leaf blight, pathogen identification, biological, characterization, fungicides screening

广西莪术(*Curcuma kwangsiensis)*，为姜科(Zingberaceae)，姜黄属(*Curauma* L.)植物，又称“毛莪术”或“桂莪术”，与蓬莪术(*C. phaeocaulis*)、温郁金 (*C. wenyujin*)同为中药材莪术的基源植物（中国植物志，1981；中华人民共和国药典，2020）。中药材莪术为历版《中国药典》收载品种，是广西“桂十味”道地药材，具有行气破血、消积止痛、清心凉血等功效，现代研究表明莪术中含有挥发油类和姜黄素类活性化学成分，这两类成分都具有抗肿瘤、抗凝血、抗血小板聚集等功效（李泽宇等，2021）。随着莪术药用功效的不断挖掘和开发，药材需求量不断增加，广西莪术种植面积也随之在逐年扩大，由 2022 年的 2 333 hm^2 扩大至 3 333 hm^2（2023 年），主要分布在钦州市灵山县、玉林市博白县、贺州市八步区、南宁市隆安县等多个市县，其中钦州市灵山县是广西莪术道地核心产区，占全广西种植面积的 40%。

叶部病害是影响广西莪术生长过程中的一类重要病害，广西灵山县陆屋镇叶枯病在 2022—2023 年发生严重，病害发生率为 30%~50%，严重发生的地块发病率高达 80%。病害田间症状多表现为：早期在叶尖、叶缘或叶中处出现黄色斑点，随着病原菌的不断侵染，病斑逐渐向叶中脉扩展，引起叶片大面积枯黄，后期整株萎蔫枯死，严重影响广西莪术的栽培生产。关于广西莪术病害的研究，仅见蒋妮等报道茎点霉属真菌 *Phomopsis* sp.引起广西隆安县栽培种植的广西莪术叶斑病，与其症状相似但是不同，在田间容易混淆，叶斑病形成边缘褐色、中间暗褐色并凹陷的“V”形大病斑，病斑上可见黑色小颗粒（分生孢子器）（蒋妮等，2016），还有王晗怡报道由间座壳属真菌引起广西莪术叶枯病病原菌发病症状与蒋妮报道的相似，并对该病原菌进行形态和分子鉴定，研究结果与蒋妮报道的不是同一种病原菌（王晗怡，2023）。还有少量研究姜黄属植物叶部病害的报道，如李珊珊报道由拟盘多毛孢属 *Neopestalotiopsis asiatica* 真菌可引起蓬莪术叶枯病，并对该病原菌进行了生物学特性和室内药剂筛选的研究（李珊珊，2021）；冯阿芳和马瑞对温郁金叶部病害进行研究，结果发现由辣椒炭疽菌(*Colletotrichum urcumaei*)和郁金炭疽菌(*C. curcumae*)引起温郁金的叶斑病，而张兴国仅描述了温郁金炭疽病的发病症状和化学防治，没有做详细的研究（张兴国等，2005；冯阿芳，2012；马瑞，2018）。蓬莪术、温郁金病原菌的鉴定均采用了目前的常用的形态鉴定结合构建分子系统发育树的方法（多个序列），但广西莪术仅通过 ITS 测序，鉴定到属，未能明确种且病样来源为广西隆安县，在核心产区灵山县发生的广西莪术叶枯病的致病菌、生物学特性和室内药剂的种类与前人报道的是否一致目前尚不清楚。

基于以上情况，对于广西莪术主产区灵山的叶枯病病原菌是否与隆安地区的一致，以此

为防治靶标筛选出有效的防治药剂，同时掌握病原菌生物学特性，对今后制定防治策略，实现病害的科学防治具有重要意义。为此，本研究通过常规组织分离法对广西钦州市灵山县的广西莪术叶枯病病原菌进行分离纯化，并进行致病性测定，再结合形态和多基因序列分析确定病原菌的分类地位，测定其生物学特性，并研究 4 种杀菌剂对致病菌的室内抑制活性，为广西莪术的田间防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

样品来源：广西莪术为一年生植物，3 月份种植，病叶采集于 2022 年 7 月采集于广西钦州灵山陆屋镇（109º17′27.60″ E、22 º 24′59.36″ N）。

供试培养基：马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）、马铃薯蔗糖培养基(PSA)、燕麦粉琼脂培养基(OMA)、玉米粉琼脂培养基(CMA)、沙氏培养基(SDA)，其主要配方参考曹秀秀文献方法（曹秀秀，2021）。

供试化学药剂：室内抑菌试验的药剂见表 1。

表 1　4 种杀菌剂名称、剂型、浓度及生产厂家

Table 1 Name, dosage form, concentrations and manufacturer of 4 fungicides

杀菌剂/剂型 Fungicide name/dosage form	浓度 Concentrations ($\mu g \cdot mL^{-1}$)	生产厂家 Manufacturer
98%噁霉灵 SP 98% oxamiline SP	49、24.5、12.25、6.125、3.062 5	天津市绿亨化工有限公司 Tianjin Luheng Chemical Co., Ltd.
75%肟菌·戊唑醇 WG 75% trifloxystrobin tebuconazole WG	2.5、1.25、0.625、0.312 5、0.156 25	拜尔作物科学（中国）有限公司 Bayer CropScience China Co., Ltd.
250 $g \cdot L^{-1}$ 吡唑醚菌酯 EC 250 $g \cdot L^{-1}$ pyraclostrobine EC	0.625、0.312 5、0.156 3、0.078 13、0.039 06	巴斯夫植物保护（江苏）有限公司 BASF Crop Protection (Jiangsu) Co.,Ltd.
10 亿$\cdot g^{-1}$ 哈茨木霉菌 SC 10 bn$\cdot g^{-1}$ trichoderma harzianum SC	10、5、2.5、1.25、0.625	山东田当家生态农业科技有限公司 Shandong Tiandangjia Ecological Agricultural Technology Co., Ltd.

1.2 试验方法

1.2.1 病原菌分离纯化

参考方中达《植病研究方法》（方中达，1998）的常规组织法分离，取新鲜感病样品的病健交界处，剪取 5 mm × 5 mm 大小的组织块，用 75%乙醇消毒 30 s，2.5%的次氯酸钠消毒 3 min，无菌水冲洗 3 遍，晾干，然后转接到 PDA 培养基上，置于恒温 28 ℃培养箱培养，待长出菌落后，将新长出的菌丝尖端转入新的 PDA 平板，纯化于 PDA 培养基上培养 5 d 备用。

1.2.2 致病性测定试验

采用叶片离体试验进行致病性测定。选取健康广西莪术幼苗的叶片，先用自来水冲洗叶片表面的灰尘，晾干，再用 75%乙醇进行表面消毒，于叶片正面中部对称的两边用无菌接

种针形成伤口，在培养基上取直径 8 mm 菌块，菌丝朝向接种叶片伤口处，以 PDA 为对照，28 ℃恒温培养箱培养，每处理 3 次重复，每天观察并记录叶片发病情况。叶片发病后再次分离，并鉴定与接种用的菌株形态是否一致，完成柯赫氏法则验证（谢联辉，2006）。

1.2.3 病原菌鉴定

参考方中达的方法（方中达，1998）记录菌落形态，参考魏景超的方法（魏景超，1979）和国际分类网站（http：//www.indexfungorum.org）进行菌落形态初步鉴定。参考 Kumar 等（Kumar et al., 2016）的方法，利用 MEGA 7.0 的邻位连接法构建 ITS rDNA 系统发育进化树，进行分子生物学鉴定；采用 MightyAmp DNA Polymerase Ver.3 (1.25 U/50 μL)试剂盒（Takara Bio Inc.，Japan，cat. no. R076A），利用核糖体 DNA 内部转录间隔区 ITS（ITS1/5′-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3′、ITS4/5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′）（White et al.,1990）、β-微管蛋白 TUB（T1/5′-AACATGCGTGAGATTGTAAGT-3′、Bt-2b/5′-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3′）（Dong et al., 2021）进行 PCR 扩增，挑取培养内生真菌的菌落作为模板直接用于 PCR 反应，扩增反应体系：2×MightyAmp Buffer 25 μL，10×Addtitive for High Specificity 5 μL，引物 ITS1 和 ITS2（15 pmol）和β-微管蛋白 TUB（T1/Bt-2b）各 1.5 μL，加 ddH_2O 定容至 50 μL。PCR 反应条件：98 ℃预变性 2 min，98 ℃变性 10 s，60 ℃退火 15 s，68 ℃延伸 60 s，40 个循环，最后 68 ℃延伸 10 min。空白对照为 ddH_2O。利用 1.0 %的琼脂糖凝胶电泳检测目的条带，将有目的条带的 PCR 产物送至生工生物工程（上海）股份有限公司测序，所得序列在 NCBI GenBank 进行 BLAST 比对，下载邻近属种序列，应用 MEGA7.0 软件邻接法（neighbor-joining，NJ）构建多基因系统发育树。

表 2 参与多基因序列分析的菌株 NCBI 登录号信息

Table 2 Information of strains and NCBI accession number used in multigene phylogenetic analysis

物种 Species	菌株编号	NCBI 登录号 NCBI accession number	
	Strain code	ITS	TUB
菜豆间座壳 *Diaporthe phaseolorum*	CBS 116020	KC343176	MW595779
菜豆间座壳 *D. phaseolorum*	CBS 116019	KC343175	MW595780
菜豆间座壳 *D. phaseolorum*	CBS 127465	KC343177	KC344142
香港间座壳 *D. hongkongensis*	CBS 115448	KC343119	MT749776
香港间座壳 *D. hongkongensis*	CBS 115448 T	NR111848	OR806914
油杉拟盘多毛孢 *Pestalotiopsis arceuthobii*	CBS 433.65	MH554046	KM199427
油杉拟盘多毛孢 *P. arceuthobii*	CBS 434.65 T	NR147561	MH554722
油杉拟盘多毛孢 *P. arceuthobii*	CBS 434.66	KM199341	ON101251
尖孢炭疽 *Colletotrichum acutatum*	CBS 127534	MH864559	JQ950047
尖孢炭疽 *C. acutatum*	CBS 797.72 T	MH860607	JQ950048
尖孢炭疽 *C. acutatum*	CBS 126521	MH864144	JQ950052
变红镰刀菌 *Fusarium incarnatum*	CBS 163.57	MH857681	MK439850
嘴突凸脐蠕孢 *Exserohilum rostratum*	CBS 273.52	MH857032	MT348153
嘴突凸脐蠕孢 *E. rostratum*	CBS 229.39	MH855990	MT348153
嘴突凸脐蠕孢 *E. rostratum*	CBS 131565	MH865917	MW133269
Gaertneriomyces semiglobiferus	AFTOL-ID 34	AY997051	AY138778

注：T 为模式菌株。

Note: T indicates type strain.

1.2.4 病原菌的生物学特性

选用广西莪术叶枯病病原菌进行生物学特性试验，设置培养基、温度、光照、pH 值、

碳源和氮源等 6 个变量进行生物学特性，参考曹秀秀和但雨柔的设计（曹秀秀，2021；但雨柔，2023），其方法略有改进。

（1）不同培养基对病原菌生长的影响

马铃薯葡萄糖琼脂培养基（PDA）、马铃薯蔗糖培养基（PSA）、燕麦粉琼脂培养基（OMA）、玉米粉琼脂培养基（CMA）和沙氏培养基（SDA）。将广西莪术病菌菌株组织块（直径为 6 mm）接种于 5 种培养基的中央，每皿置放 1 个菌饼，每个处理重复 3 次，置于 28℃的培养箱中黑暗培养 5 d，采用十字交叉法测量菌落大小，找到最适培养基。

（2）不同温度、光照及 pH 值对病原菌生长的影响

在 PDA 培养基上接种广西莪术病菌菌株组织块（直径为 6 mm）分别置于 5、10、15、20、25、28、30、35、40 ℃的培养箱里进行黑暗培养；光照设置处理为 L/D=24 h/0 h、L/D=0 h/24 h、L/D=12 h/12 h 3 种，温度设置为恒温 28 ℃；用浓度为 1 $mol \cdot L^{-1}$ 的 HCl 溶液和 NaOH 溶液配制 pH 为 2、3、4、5、6、7、8、9、10 不同梯度的 PDA 培养基。各处理条件设置 3 个重复，每日观察，5 d 后用十字交叉法测量菌落大小。

（3）不同致死温度对病原菌生长的影响

参考曹秀秀和但雨柔的方法，研究病原菌菌落的致死温度（曹秀秀，2021；但雨柔，2023）。

（4）不同碳源、氮源对病原菌生长的影响

以 PDA 培养基为基础培养基，将 2%添加量的葡萄糖替换为相同质量的蔗糖、葡萄糖、α-乳糖、可溶性淀粉、甘露醇、肌醇作碳源；以查氏培养基为基础培养基，将 0.3%添加量的硝酸钠替换为相同质量的硝酸钠、硫酸铵、半胱氨酸、蛋白胨、硝酸钾作为氮源。每皿放 1 个菌饼，每个处理 3 次重复，放置 28 ℃恒温培养箱中黑暗培养 5 d，观察菌落的形态，采用十字交叉法测量菌落直径。

1.2.5 室内药剂筛选

采用菌丝生长速率法对广西莪术叶枯病菌进行毒力测定。将病原菌接种到 PDA 培养基上培养 5 d 后，将菌饼（直径为 6 mm）按照供试药剂母液设定的浓度比例加入到已融化冷却至 50 ℃左右的 PDA 培养基中，混匀后倒入无菌培养皿中，制成含不同浓度药剂的平板（以不加供试药剂的 PDA 培养基作为空白对照），在 28 ℃恒温培养箱中培养 6 d，每个处理 3 个重复，采用十字交叉法测量菌落直径做好记录并计算抑菌率。供试 EC_{50} 浓度参照表 1。

菌丝生长抑制率＝[（对照菌落直径-菌饼直径）-（处理菌落直径-菌饼直径）]/（对照菌落直径-菌饼直径）×100%。

利用 SPSS19.0 来计算 EC_{50}、斜率±标准误差、卡方值、自由度和 P 值。

1.2.6 实验数据处理

本实验的数据统计处理采用 SPSS 19.0 进行单因素方差分析（one-way ANOVA），选用 LSD 和 Duncan’s 新复极差法进行组间的多重比较，不同小写字母表示差异显著（$P<0.05$）。生物学特性的柱状图采用 Origin 2018 软件进行制图分析。

2 结果与分析

2.1 广西莪术叶枯病症状及病原菌致病性测定

田间调查发现广西莪术叶枯病在老叶和嫩叶均可发病，一般从叶尖或叶缘开始发病，发病率 30%~50%。症状早期表现为叶片出现淡黄色斑点，周围有黄色晕圈，随着病情的发展，病斑逐渐由叶缘向叶片内部扩展，严重时扩展至整个叶片，导致整株叶片发黄枯萎（图 1：A、B）。

从采集的 5 张病叶样品中共分离菌株 8 株菌株，菌落形态为白色絮状，分离率最高，达到 87.5%，将这 8 株都进行刺伤接种，发现只有分离频率最高的菌株 E-10 成功侵染，发病

最快。将菌株 E-10 接种于健康的广西莪术叶片上，48 h 开始发病，病斑呈水渍状，到接种 4 d 时病斑外围有明显的黄色晕圈，接种 6 d 后病斑完全黄化枯萎，与田间发病症状相似（图 1：C、D、E），对照叶片未见感病症状（图 1：F）。再次重新分离发病的叶片，得到的菌株与接种病菌一致，由此验证柯赫氏法则，确定广西莪术病菌菌株 E-10 为致病菌。



A、**B**. 广西莪术叶枯病的田间症状；**C**. 接种 2 d 症状；**D**. 接种 4 d 症状；**E**. 接种 6 d 症状；**F**. 对照。
A, **B**. Field symptoms of *Curcuma kwangsiensis* leaf spot; **C**. Vaccinate 2 days for symptoms; **D**. Vaccinate 4 days for symptoms; **E**. Vaccinate 6 days for symptoms; **F**. Control.

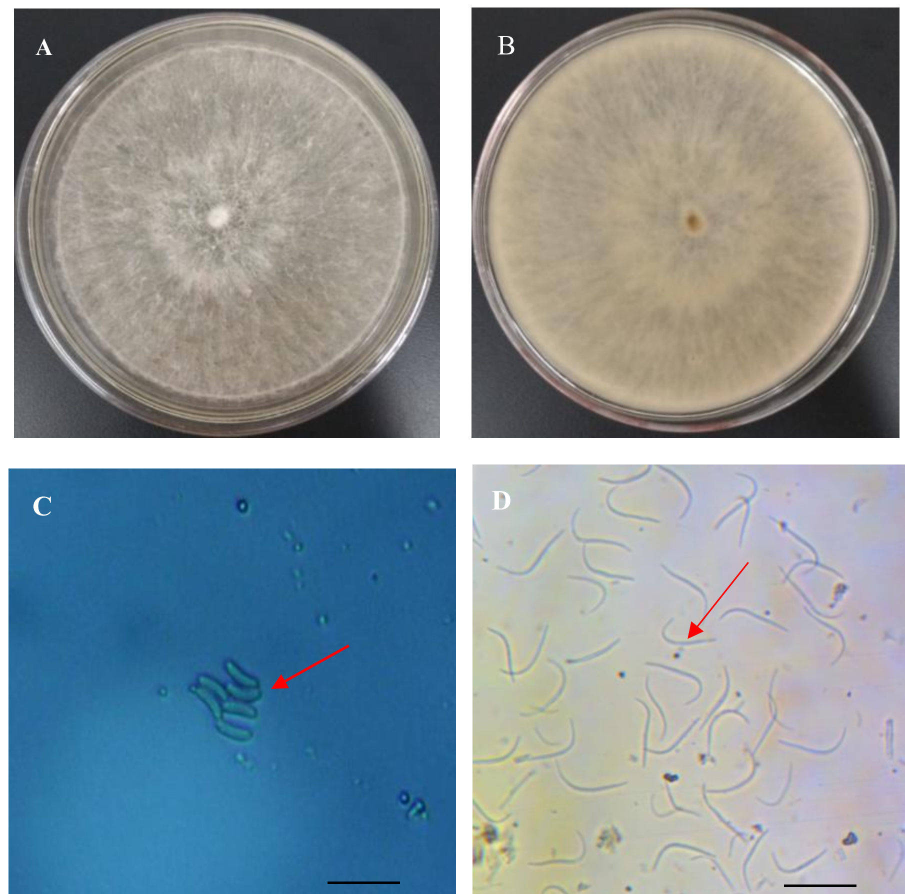
图 1 广西莪术叶枯病田间症状和致病性测定

Fig.1 Field symptoms of *Curcuma kwangsiensis* leaf spot and pathogenicity test

2.2 病原菌的形态鉴定

由图 2：A、B 可知，菌株 E-10 菌落正面为白色絮状，菌落呈散射状，菌落背面为米黄色无轮纹；在光学显微镜下观察到α型分生孢子为长圆形（图 2：C），两端较平，单胞，大小为（3.05~3.35）μm×（0.81~1.16）μm，β型孢子为线型（图 2：D），一端呈弯钩状，较尖，另一端平而圆润，大小为（16.87~24.98）μm ×（0.89 ~1.68）μm。根据上述形态特征，

初步认为病原菌 E-10 为间座壳属 *Diaporthe* sp.真菌。



A. 菌落正面；**B**. 菌落反面；**C**. α型孢子；**D**. β型孢子。标尺=50 μm。

A. Colony positive; **B**. Colony opposite; **C**. α spores; **D**. β spores. Bar=50 μm.

图 2　菌株 E-10 菌落形态特征

Fig. 2 Morphological characteristics of strain E-10

2.3 病原菌的生物学特性

2.3.1 不同温度对 E-10 病原菌菌丝生长的影响

由图 3：A 可知，菌株 E-10 在 10~35 ℃均能生长，适宜温度范围在 25~30 ℃，在较低（5 ℃）和较高（40 ℃）温度下菌丝不再生长，培养 5 d 后，在 25 ℃和 28 ℃下菌丝生长直径最大分别达 8.50 cm 和 8.32 cm，这两者温度差异不显著（P>0.05），但与其他温度处理差异显著（P<0.05）；超过 30 ℃时菌株 E-10 菌丝对温度比较敏感。故 E-10 病原菌的菌丝生长最适温度为 25~28 ℃。

菌株 E-10 经不同温度处理 20 min 后，其菌落还能长出菌丝，然后把 55 ℃加了 2 个梯度，结果发现 56 ℃时菌丝停止生长，故菌株 E-10 菌丝致死温度为 56 ℃下处理 20 min。

2.3.2 不同光照对病原菌 E-10 的生长影响

由图 3：B 可知，菌株 E-10 在 L/D= 24 h/0 h、L/D= 12 h/12 h、L/D= 0 h/24 h 3 种条件下均能生长，并均有黄色色素产生，菌落直径分别为 8.35、6.2、4.97 cm，以 L/D= 24 h/0 h 条件下生长最佳，与 L/D= 0 h/24 h 条件下的菌丝生长有显著差异（P<0.05），说明菌丝生长对光照的要求比较高。

2.3.3 不同 pH 对病原菌 E-10 菌丝生长的影响

由图 3：C 可知，病原菌 E-10 菌丝在 pH 2~10 均能生长，其中，pH 值为 5、6、7 时菌落直径分别为 5.85、5.83、7.58 cm，三者的菌落直径差异不显著（P>0.05），但与其他 pH

条件存在显著差异（$P<0.05$），这说明该菌适宜在偏酸和中性环境生长。

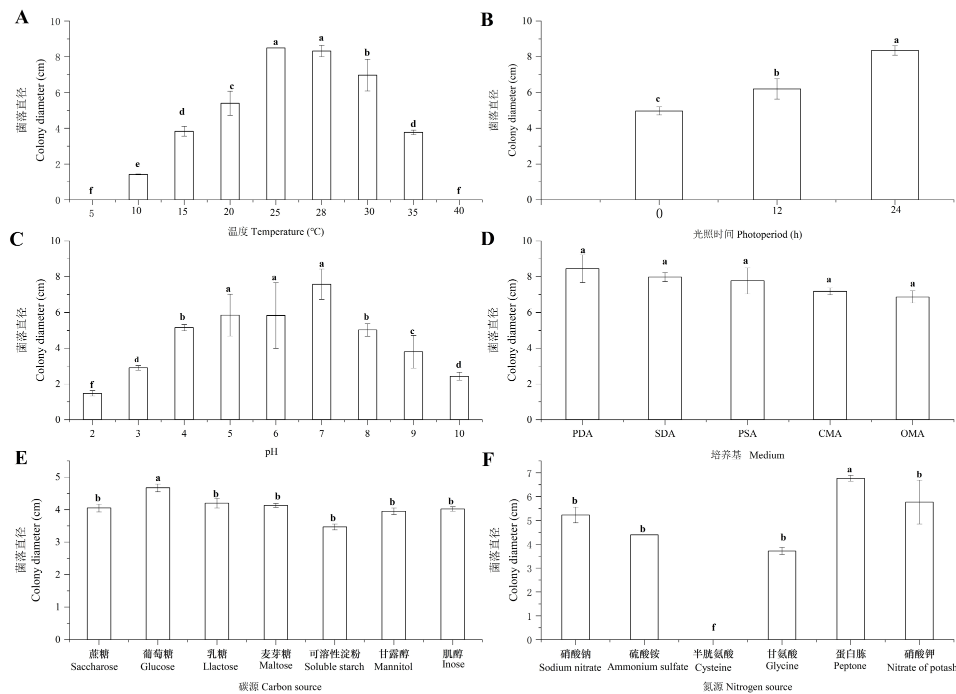
2.3.4 不同培养基对病原菌 E-10 菌丝生长的影响

由图 3：D 可知，病原菌 E-10 菌丝在 5 种培养基上均能生长，其中在 PDA 上生长最快，培养 5 d 菌落直径为 8.45 cm 且菌丝浓密，其后依次沙氏培养基（SDA）、蔗糖琼脂培养基（PSA）、玉米粉琼脂培养基（CMA）、燕麦粉琼脂培养基（OMA）这 5 种培养基菌落直径差异不显著（$P>0.05$）。故这 5 种培养基都最适合 E-10 菌丝的生长。

2.3.5 不同碳氮源对病原菌 E-10 菌丝生长的影响

由图 3：E 可知，病原菌 E-10 在供试的 7 种碳源培养基上菌丝均能生长，其中菌落直径最大的是葡萄糖 4.67 cm，与其他碳源有显著性差异（$P<0.05$），其次依次为 a-乳糖、麦芽糖、蔗糖、肌醇、甘露醇，最小的是可溶性淀粉，直径为 3.47 cm。

由图 3：F 可知，在供试的 6 种氮源中，病原菌 E-10 对蛋白胨利用率最高，菌丝生长较好，气生菌丝茂密，菌落直径最大，为 6.77 cm，与其他氮源存在差异显著（$P<0.05$）。对半胱氨酸不能利用，病原菌 E-10 不能在琼脂培养基生长。综上，病原菌 E-10 碳氮源分别是葡萄糖和蛋白栋。



图中不同小写字母表示不同处理经 LSD 和 Duncan’s 新复极差法差异显著（$P<0.05$）。

Different lowercase letters indicate significant differences among different treatments by LSD and Duncan’s new complex range methods ($P<0.05$).

图 3 病原菌菌株 E-10 的生物学特性

Fig. 3 Pathogenic strain of E-10 of biological characteristics

2.4 病原菌的分子生物学鉴定

病原菌菌株 E-10 经 ITS 和 TUB 基因序列测定，得到序列长度分别为 547 bp 和 741 bp，经 BLAST 比对，与间座壳属的菜豆间座壳同源性很高，达 99%。下载相关的参考序列，利用 ITS、TUB 序列联合构建系统发育树，结果发现（图 4），菌株 E-10 与间座壳属的菜豆

间座壳聚集在一个分支，支持率均达到 99%。结合传统的形态特征和分子系统发育树分析的结果，确定菌株 E-10 为间座壳属真菌菜豆间座壳，其在 GenBank 登录号分别是 OK175678、OK326872。

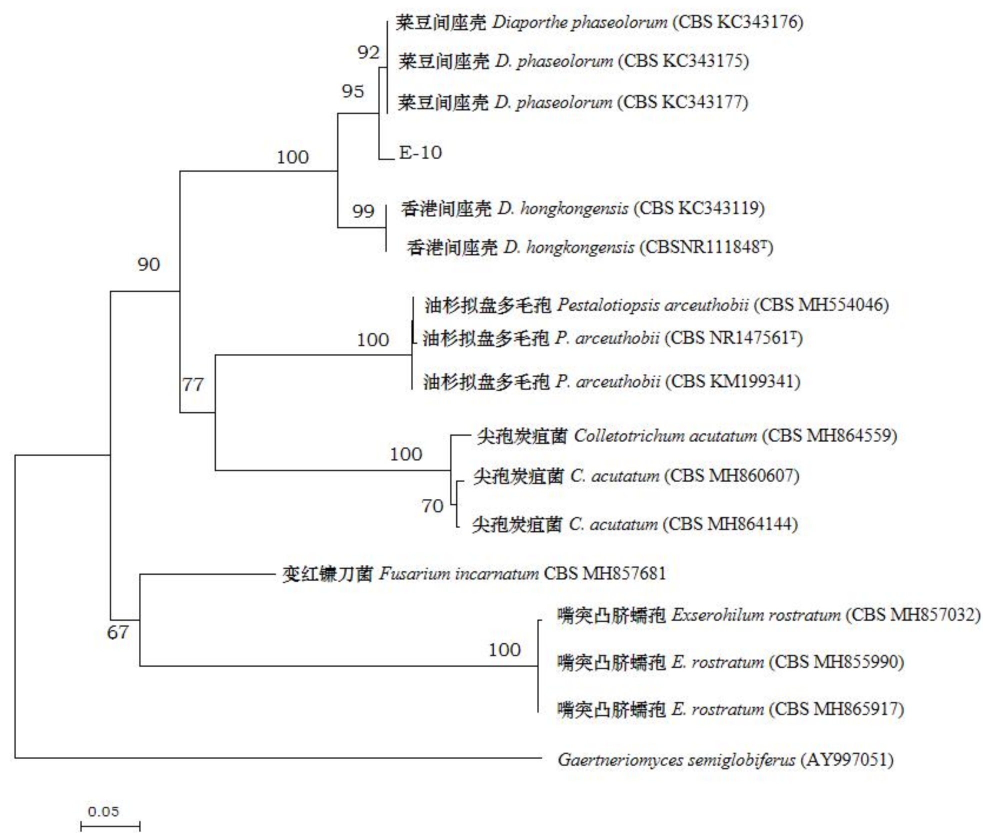


图 4 基于 ITS、β-tub 基因联合构建的系统发育树（*Gaertneriomyces semiglobiferus* AY997051 外类群）

Fig. 4 Phylogenetic tree based on the combination of ITS and β-tub genes（*Gaertneriomyces semiglobiferus* AY997051 outgroup）

2.5 病原菌室内药剂筛选

由表 3 可知，4 种杀菌剂对广西莪术叶枯病病原菌均有一定的抑制作用，其中 250 g·L^{-1} 吡唑醚菌酯 EC 和 75%肟菌·戊唑醇 WG 的抑菌效果较好，EC_{50} 值分别为 0.055 0、0.1216 μg·mL^{-1}，10 亿·g^{-1} 哈茨木霉菌 SC 和 98%噁霉灵 SP，EC_{50} 值分别为 1.998 6、4.173 6 μg·mL^{-1}。综上这 4 种杀菌剂均可考虑为田间防治广西莪术叶枯病的候选药剂。

表 3　4 种杀菌剂对病原菌的室内毒力

Table 3　Indoor toxicity testing of four fungicides against *Diaporthe phaseolorum*

杀菌剂 Fungicides	抑制中浓度（95%置信区间）EC_{50}（95%FL）(μg·mL^{-1})	斜率±标准误 Slope ± Standard error	卡方值（自由度）χ^2（*df*）	*P*
98%噁霉灵 SP 98% oxamiline SP	4.173 6 (3.346 2～5.205 7)	1.229 8±0.091	2.726（3）	0.436
75%肟菌·戊唑醇 WG 75% trifloxystrobin · tebuconazole WG	0.121 6 (0.064 2～0.230 1)	0.944 4±0.099	1.149（3）	0.765
250 g·L^{-1} 吡唑醚菌酯 EC	0.055 0 (0.019 9～0.151 9)	3.502 5±0.116	2.679（3）	0

250 g·L^{-1} pyraclostrobine EC				
10 亿·g^{-1} 哈茨木霉菌 SC 10 bn·g^{-1} trichoderma harzianum SC	1.998 6 (1.637 5～2.439 3)	1.202 6±0.089	1.148（3）	0.09

注：SP、WG、EC、SC 分别表示可溶粉剂、水分散粒剂、乳油和悬浮剂。

Note: SP, WG, EC and SC stand for soluble powder, water dispersible granule, emulsifiable concentrate and suspension agent, respectively.

3 讨论与结论

间座壳属(*Diaporthe*)真菌主要采取无性型和有性型双重命名法，其无性型和有性型分别为拟茎点霉属(*Phomosis*)和间座壳属，自 2011 年在墨尔本的命名会议上，决定弃用双命名系统，采用“一个真菌一个名称”规则，该属真菌被命名为间座壳属（魏景超，1979），间座壳属由于发表时间比拟茎点霉属早而取得该属命名上的优先权，所以拟茎点霉属这一名称逐渐被弃用（Taylor, 2011）。间座壳属真菌可为害叶片、枝干和果实等部位发病，很少侵染根部，主要表现为坏死、叶片斑点、溃烂、萎蔫和枯死等症状，造成严重的经济损失（Stantos et al., 2009; Manawasinghe et al., 2019；俞婷，2021；陈瑶，2020）。本研究主要为害广西莪术的叶片，呈现枯死症状，与前人研究的症状相似（蒋妮等，2016；李珊珊，2021；王晗怡，2023），但病原菌种类和生物学特性不同，可能由于采样的时间、地点和环境不同导致结果也存在差异。本文通过柯赫氏法则验证了分离的菌株 E-10 对广西莪术叶枯病的致病性，利用形态学和分子生物学（多基因序列 ITS、TUB）鉴定，确定引起广西莪术叶枯病的病原菌为间座壳属真菌菜豆间座壳，其无性阶段为拟茎点霉属 *Phomosis* 真菌，这个病原菌侵染广西莪术叶片枯萎的研究是首次报道。

关于菜豆间座壳生物学特性的研究较少，主要集中大豆茎部病害（沈浩，2015），蓝莓座壳茎溃疡病和猕猴桃黑点病也有人报道（李媛等，2017; Thomidis et al., 2019; 王丽，2022），但关于其他间座壳属真菌报道较多。如 *Diaporthe tulliensis* 可引起桐树叶斑病、可可豆荚腐病和猕猴桃茎溃疡病等植物病害，随着种植规模的扩大，其为害程度也有增大的趋势（Bai et al., 2017；李泽宇等，2022; Serrato-diaz et al., 2022）。间座壳属真菌菌株不同，其生物学特性也不一致。陈瑶和符致蕾等人研究发现降香黄檀叶枯病菌（*Phomopsis asparagi*）和杧果枝枯病病原菌（*P. mangiferae*），最适宜的生长温度为 25~30 ℃，最适宜的 pH 分别为 6 和 7，光照对这两种病原菌的生长均没有显著影响（符致蕾等，2017；陈瑶，2020），这一结果与本研究的生长温度和 pH 范围一致。顾立明等人报道桃枝枯病病原菌（*P. amygdali*）适宜在 PDA、PSA 和燕麦培养基上生长，20~25 ℃适宜菌丝生长，最适碳氮源分别为蔗糖和硝酸钾、丙氨酸，最适宜的 pH 值为 6~7 与本文报道的 pH 范围一致，与其他条件有一定的差异，这可能由于寄主和病原菌种类不同，所种植的地理位置和生境不同，导致生物学特性存在差异（顾立明等，2013）。同一病原真菌因面对不同植物和不同生境所表现出的生物学特性也存在着一定差异（何彩梅，2011）。*P. eucommicola* 是引起杨树黑斑型溃疡病和杜仲树皮腐烂病的病原真菌，为害杨树的病原菌最适的菌丝生长温度为 22 ℃，最适 pH 值为 5.5，而此病原菌为害杜仲的最适菌丝生长温度为 30 ℃，最适 pH 值为 7（郑华英等，2011）。此外，同病原菌在同一寄主上，其生物学特性也是不同，研究茄褐纹病菌 *P. vexans* 生物学特性发现，该菌生长最适温度有 25 ℃和 28 ℃，最适 pH 值有为 6 和 7，全黑暗和自然光条件下菌丝生长速率都快，最佳碳源和氮源分别有为麦芽糖、蔗糖和蛋白胨、硝酸钾、硝酸钠（马珂，2005；叶莹等；2021）。

本试验通过 4 种杀菌剂对广西莪术叶枯病菌均表现较强的毒力，其中 250 g·L^{-1} 吡唑醚菌酯 EC 和 75%肟菌·戊唑醇 WG 的抑菌效果较好，其次是 10 亿·g^{-1} 哈茨木霉菌 SC 和 98%噁霉灵 SP。吡唑醚菌酯和肟菌·戊唑醇是甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂，通过抑制线粒体呼吸作

用，最终导致细胞死亡，具有很强的渗透性和内吸传导功能，对病害具有预防、保护、治疗、铲除等多种功能。75%肟菌·戊唑醇水分散粒剂（WG）、32.5%苯甲·嘧菌酯悬浮剂（SC）等药剂对太子参叶斑病的防效到达 80%以上（王怀震，2014）。97%嘧菌酯原药对蓬莪术（*Curcuma phaeocaulis*）分生孢子萌发有较强抑制作用，EC_{50} 分别是 0.027 7 μg·mL^{-1}（李珊珊，2021）。马瑞测定 10 种杀菌剂对海南温郁金（*Curcuma wenyujin*）白绢病病原菌的室内毒力，结果表明吡唑醚菌酯的抑菌效果较强，EC_{50} 小于 1 μg·mL^{-1}（马瑞，2018）。Tao 等（2020）发现黄精叶枯病菌（*Diaporthe eres*）对咪鲜胺、戊唑醇和吡唑醚菌酯有较高的敏感性。以上结果，与本研究结果较为一致，表明吡唑醚菌酯和戊唑醇类对广西莪术叶枯病菌具有较好的敏感性，可为田间防治提供了技术支撑。此外，本文还发现生物源杀菌剂哈茨木霉菌对广西莪术叶枯病间座壳属病菌菜豆间座壳有较好的抑菌效果，为广西莪术叶枯病的科学用药提供理论支持。由于本试验结果在室内条件完成，故还需进一步在田间试验进行验证。

参考文献：

BAI Q, WANG GP, HONG N, et al., 2017. First report of *Diaporthe tulliensis* and *Diaporthe actinidiae* causing kiwifruit stem canker in Hubei and Anhui provinces, China[J]. Plant Disease, 101(3): 508-509.

CAO XX, 2021. Investigation of eucalyptus disease and chemical control of eucalyptus ring spot[D]. Nanning: Guangxi University: 22-24. [曹秀秀，2021. 桉树病害调查及轮斑病的防治试验[D]. 南宁：广西大学：22-24.]

CHEN Y, LI HY, ZHOU DM, 2020. Identification and biological characteristics of *Dalbergia odorifera* leaf blight[J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 41(5): 1007-1012. [陈瑶，李航宇，周德明，2020. 降香黄檀叶枯病菌的鉴定及其生物学特性[J]. 热带作物学报，41(5)：1007-1012.]

Editorial Committee of Flora of China, Chinese Academy of Sciences, 1981. Flora Reipublicae Popularis Sinicae: Volume 16 [M]. Science Press: 59. [中国科学院《中国植物志》编辑委员会，1981. 中国植物志：第 16 卷［M］. 北京：科学出版社: 59.]

Chinese Pharmacopoeia Commision, 2020. Pharmacopoeia of the People's Republic of China: Part I [S]. Beijing: China Medical Science Press: 217. [国家药典委员会，2020. 中华人民共和国药典：一部[S]. 北京：中国医药科技出版社，217.]

DONG H, MU TC, ZHANG ZX, et al., 2021. Molecular phylogenetic analysis reveals two new species of *Diaporthe* from Yunnan Province, southwestern China[J]. Mycosystema, 40(3): 436-446.

DAN YR, TANG ZX, MA WL, et al., 2023. Identificaton, biological characterization, and fungicide screening of the pathogen causing *Polygonatum cyrtonema* Hua anthracnose[J]. Acta Phytopathologica Sinica, 53(5):796-809. [但雨柔，汤子萱，马万里，等，2023. 多花黄精炭疽病菌的鉴定、生物学特性及防治药剂筛选[J]. 植物病理学报，53(5)：796-809.]

FANG ZD, 1998. Plant pathology research method[M]. Beijing: China Agriculture Press: 212. [方中达，1998. 植病研究方法[M] . 北京：中国农业出版社：212.]

FENG AF, 2012. Studies on anthracnose of radix curcumae[D]. Ya'an: Sichuan Agricultural University: 18-20. [冯阿芳，2012. 郁金炭疽病的研究[D]. 雅安：四川农业大学：18-20.]

FU ZL, YANG SY, ZHANG R, et al., 2017. Study on the biological characteristics of *Phomossis mangiferae* of mango branch blight[J]. South China Fruits, 46(2): 74-76-80. [符致蕾，杨石有，张蕊，等，2017. 芒果枝枯病拟茎点霉菌生物学特性研究[J]. 中国南方果树，46(2)：74-76-80.]

GU LM, FANG L, XIONG CZ, et al., 2013. Study on biological characteristics of branch blight of

peach[J]. Journal of Zhejiang Agricultural Science(9): 1142–1144. [顾立明，方丽，熊彩珍，等，2013. 桃枝枯病菌的生物学特性研究[J]. 浙江农业科学(9): 1142–1144.]

HE CM, 2011. Endophytic fungal diversity and their secondary metabolites of eleven dominant plant species in the dry-hot vally of Yuanjiang, Yunnan Province, China[D]. Kunming: Kunming University of Science and Technology: 3-5. [何彩梅，2011. 云南元江干热河谷优势植物内生真菌多样性及其次生代谢产物研究[D]. 昆明：昆明理工大学：3-5.]

JIANG N, LIU LH, HU FY, et al., 2016. Identification of *Curcuma kwangsiensis* leaf spot pathogen and observation of its biological characteristics[J]. Modern Chinese Medicine, 18(5): 616-619. [蒋妮，刘丽辉，胡凤云，等，2016. 广西莪术叶斑病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 中国现代中药，18(5)：616-619.]

KUMAR S, STECHER G, TAMURA K, 2016. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets[J]. Molecular Biology and Evolution, 33(7): 1870-1874.

LI SS. 2021. Pathogen identification and fungicides screening of *Curcuma phaeocaulis* leaf blight[D]. Chongqing: Southwest University:12-14. [李珊珊，2021.莪术叶枯病病原鉴定及室内药剂筛选[D]. 重庆：西南大学：12-14.]

LI Y, SHI LB, FEI NY, et al., 2017. Identification and biological characteristics of a blueberry *Diaporthe* stem caker pathogen[J]. Plant protection, 43(1): 89-94. [李媛，石凌波，费诺亚，等，2017. 蓝莓间座壳茎溃疡病病原鉴定及生物学特性研究[J]. 植物保护，43(1)：89-94.]

LI ZY, CAO R, HAO EW, et al., 2021. Research progress on chemical constituents and pharmacological effects of *Curcuma kwangsiensis* and prediction of its quality marker (Q-Marker)[J]. Chinese Herbal Medicine, 52(15): 4687-4699. [李泽宇，曹瑞，郝二伟，等，2021. 广西莪术化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J]. 中草药，52(15)：4687-4699.]

LI ZY, HAO EW, DU ZC, et al., 2022. Research progress of *Curcuma kwangsiensis* root tubersand analysis of liver protection and anti-tumor mechanisms based on Q-maker[J]. China Journal of Chinese Materia Medica, 47(7)：1739-1753. [李泽宇, 郝二伟, 杜正彩, 等， 2022. 桂郁金研究进展及基于质量标志物的保肝、抗肿瘤机制分析[J]. 中国中药杂志，47(7)：1739-1753.]

MA K, 2005. Studies on physiological characteristics, pathogenicity of *Phomopsis Vexans* and resistance of eggplant to eggplant phomopsis rot[D]. Hefei: Agricultural University of Anhui: 14-18 . [马珂，2005. 茄褐纹病菌生物学特性、致病性及寄主抗性机制的研究[D]. 合肥：安徽农业大学：14-18.]

MANAWASINGHE IS, DISSANAYAKE AJ, LI XH, et al., 2019. High genetic diversity and species complexity of *Diaporthe* associated with grapevine dieback in China[J]. Frontiers in microbiology, 10(1): 89-94.

MA R, 2018. Pathogen identification, biological characteristics and laboratory fungicides screening of two diseases on *Curcuma wenyujin* in Hainan[D]. Haikou: Hainan University: 21-29. [马瑞，2018. 海南省温郁金两种病害的病原鉴定、生物学特性及室内药剂筛选[D]. 海口：海南大学：21-29.]

SERRATO-DIAZ LM, AYALA S, GOENAGA R, 2022. First report of *Diaporthe tulliensis* and *D. pseudomangiferae* causing cacao pod rot in Puerto Rico [J]. Plant Disease, 106(9): 2530.

SHEN H, 2015. Application of Loop-mediated isotheral amplification (LAMP) in rapid detection of soybean stem pathogens[D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University: 1-3. [沈浩，2015. 大豆茎部病原菌环介导等温扩增技术快速检测的研究[D]. 南京：南京农业大学：1-3.]

STANTOS JM, PHILLIPS AJL, 2009. Resolving the complex of *Diaporthe* (*Phomopsis*) species occurring on Foeniculum vulgare in Portugal [J]. Fungal Diversity, 34: 111-125.

TAO H, WANG H, HUANG SX, et al., 2020. Identification and characterization of *Diaporthe eres* causing leaf blight disease on the medicinal herb *Polygonatum sibiricum*[J]. Journal of General Plant Pathology, 86: 468-476.

TAYLOR JW, 2011. One fungus = one name: DNA and fungal nomenclature twenty years after PCR[J]. IMA fungus, 2(2): 113-120.

THOMIDIS T, PRODROMOU I, ZAMBOUNIS A, 2019. Occurrence of *Diaporthe ambigua* Nitschke causing postharvest fruit rot on kiwifruit in Chrysoupoli Kavala, Greece[J]. Journal of General Plant Pathology, 101(4): 1295-1296.

WHITE TJ, BRUNS TD, LEE SB, et al., 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics[M]// PCR Protocols: a Guide to Methods and Applications. USA: Academic Press, 18 (1): 315-322.

WANG HY, 2023. Etiology of fungal disease of *Curcuma kwangsiensis* in Guangxi[D]. Nanning: Guangxi Minzu University: 78-81. [王晗怡，2023. 广西莪术真菌性病害的病原学研究[D]. 南宁：广西民族大学: 78-81.]

WANG HZ, 2014. Investigation on the dynamic occurrence of leaf spot disease of *Pseudostellaria heterophylla*, in Fuding and experiment of chemical control[J]. China Plant Protection, 34(3)：66-67. [王怀震，2014.太子参叶斑病在福鼎的发生动态调查及药剂防治试验[J]. 中国植保导刊，34(3)：66-67.]

WANG L, 2022. Study on occurrence regularity and green control technology of kiwifruit black spot disease[D].Yangling: Northwest A & F University: 14-16. [王丽，2022. 猕猴桃黑点病田间发生规律与绿色防控技术研究[D]. 杨凌：西北农林科技大学：14-16.]

WEI JC, 1979. Fungus identification handbook[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers: 424-430. [魏景超，1979. 真菌鉴定手册[M]. 上海：上海科学技术出版社：424-430.]

XIE LH, 2006. General Plant Pathology [M]. Beijing: Science Presss: 268.[谢联辉，2006. 普通植物病理学[M]. 北京：科学出版社：268.]

YE Y, ZENG YL, YU FS, et al., 2021. Biological characteristics of *Phomopsis vexans* and indoor toxicity intensity of its fungicides[J]. Guizhou Agricultural Sciences, 49(1): 58-63. [叶莹，曾怡林，虞凡霜，等，2021. 茄褐纹病菌的生物学特性及其防治药剂室内毒力强度[J]. 贵州农业科学，49(1)：58-63.]

YU T, 2021. Study on early warning of *Phomopsis* sp. infected kiwifruit by surface-enhanced Raman spectroscopy [D]. Hefei: Hefei University of Technology: 1-2. [俞婷，2021. 猕猴桃拟茎点霉属感染的表面增强拉曼光谱早期预警研究[D]. 合肥：合肥工业大学：1-2.]

ZHANG XG, ZHANG J, CHENG FX, et al., 2005. High-quality and high-yield cultivation techniques and pest control technology of *Curcuma longa* L[J]. Special Economic Animal and Plant(7): 26-27. [张兴国，张稷，程方叙，等，2005. 姜黄优质高产栽培及病虫害防治技术[J]. 特种经济动植物(7)：26-27.]

ZHENG HY, XU M, GAO Y, et al., 2011. Biological characteristics of pathogen on the canker disease of the new poplar plantation[J]. Journal of Jiangsu Forestry Science & Technology, 38(5): 11-12. [郑华英，徐明，高悦，等，2011. 杨树新造林黑斑型溃疡病病原菌的生物学特性试验初报[J]. 江苏林业科技，38(5)：11-12.]